

IAP12 Rec'd PCT/PTO 09 MAY 2006

**Identification de marqueurs diagnostic  
pour les encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles**

- La présente demande concerne des marqueurs biologiques des encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles et leurs utilisations dans des méthodes de diagnostic. Elle concerne également des outils et/ou kits utilisables pour la mise en œuvre de ces méthodes (réactifs, sondes, amorces, anticorps, puces, cellules, etc.), leur préparation et leurs utilisations. L'invention est utilisable pour détecter la présence d'une infection chez les mammifères, y compris en phase précoce.
- 5
- 10 Les maladies à prions, également appelées encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles ou maladies à agents transmissibles non conventionnels (ATNC) sont des maladies du système nerveux central rencontrées chez certains mammifères, dont l'homme.
- 15 Les formes les plus connues de ces maladies sont la tremblante du mouton chez les ovins, l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB) chez les bovins, la maladie de Creutzfeld-Jakob (MCJ), le kuru et l'insomnie fatale familiale chez l'homme.
- 20 L'agent infectieux n'est pas encore définitivement déterminé, mais l'hypothèse la plus acceptée est que ces maladies sont associées à l'accumulation dans le cerveau d'une protéine prion (PrP) de conformation anormale par rapport à la conformation observée chez les individus sains.
- 25 La découverte d'une nouvelle variante de MJC (vMJC) après l'épidémie bovine de ESB en Angleterre confirme que ces maladies sont transmissibles et vraisemblablement peuvent franchir la barrière des espèces par le biais de l'alimentation. Leur évolution lente et fatale, est associée à des lésions qui affectent exclusivement le système nerveux central.
- 30 Avec la découverte de vMCJ, des mesures d'urgences ont été mises en place pour évaluer l'ampleur de l'épidémie de l'ESB et pour protéger la santé publique. L'Union européenne impose désormais le test systématique de toute viande provenant de bovins abattus et âgés

de plus de 30 mois. Le temps d'incubation de l'ESB étant autour de cinq années, période durant laquelle l'infection peut se propager latéralement et verticalement, le développement d'un test diagnostique sur des animaux vivants revêt une importance vitale. Un test précoce offrirait un moyen sûr d'exclure les animaux infectés de la chaîne alimentaire. Le test utilisé aujourd'hui détecte uniquement de façon post mortem les animaux infectés à un stade tardif de la maladie.

Il y a un besoin urgent de mettre sur pied un test diagnostique capable de détecter des encéphalopathies à un stade précoce chez des animaux vivants et de façon rapide. Un tel test permettrait de suivre tous les animaux à risque en les testant de multiple fois au cours de leur vie.

La demande WO02/074986, appartenant au demandeur, décrit plusieurs marqueurs génétiques des encéphalopathies. Par une recherche extensive utilisant une approche innovante, différents marqueurs supplémentaires de l'ESB ont été identifiés et validés dans des expériences d'hybridation, permettant d'établir un test pré-symptomatique utilisable à partir du sang d'un mammifère vivant.

Les marqueurs identifiés ont été isolés par la technique DATAS (demande de brevet n° WO99/46403). DATAS identifie des différences qualitatives de l'expression de gènes et fournit une analyse systématique de l'ARN épissé entre deux conditions : sains/infecté. DATAS mène à l'identification de variants ARN fonctionnellement distincts. La technique DATAS comprend trois étapes distinctes: la collecte de tissu, l'isolement des ARNs et la construction d'un répertoire contenant des différences qualitatives et identifiant des nouveaux fragments de gènes, qui ne peuvent pas être isolés par d'autres techniques génétiques.

Par comparaison de l'expression qualitative des gènes dans les cellules sanguines de mammifères sains et infectés naturellement ou expérimentalement par l'ESB, différentes signatures de marqueurs génétiques ont été isolées. Les mammifères naturellement infectés étaient au stade final de la maladie, alors que les mammifères infectés par voie orale avec 1 g de cerveaux infectés par l'ESB, représentaient le stade précoce de la maladie.

La mise en œuvre de la méthodologie DATAS sur des cellules sanguines de vaches a permis l'identification et l'isolement de plusieurs milliers de marqueurs génétiques, répartis en deux répertoires représentatifs de l'expression qualitative des gènes entre des vaches saines et des vaches infectées naturellement d'une part, et entre des vaches saines et des vaches infectées expérimentalement d'autre part.

Les marqueurs contenus dans ces répertoires ont été sélectionnés et validés selon deux approches:

10

Dans la première approche, les fragments de gènes communs aux deux répertoires DATAS ainsi produits ont été identifiés. La séquence de ces 11 marqueurs est représentée dans les séquences SEQ ID NO: 16-26.

15 Dans la seconde approche, les différents clones des deux expériences DATAS ont été déposés sur lames de verre. Les lames ont été hybridées avec des sondes produites à partir de matériel biologique de vaches infectées naturellement ou expérimentalement et de vaches saines utilisées comme contrôle. Au travers de deux types d'analyses statistiques, SAM (Significance Analysis of Microarray) et PAM (Prediction analysis of Microarray) comparant les animaux sains versus les animaux infectés, 15 clones ont été observés  
20 comme présentant une dérégulation dans les conditions sain versus infectés. Les 15 séquences d'acides nucléiques sont décrites ci-dessous comme SEQ ID NO:1-15.

La présente demande fournit ainsi un ensemble de marqueurs biologiques qui peuvent être  
25 utilisés, seuls ou en combinaison(s), pour détecter, caractériser ou suivre une encéphalopathie spongiforme transmissible chez un mammifère. L'invention est utile notamment pour détecter la présence de maladies à prion chez des sujets mammifères, notamment ovins, bovins ou humains. Elle est particulièrement avantageuse dans la mesure où elle peut être réalisée sur des mammifères vivants, à partir de fluides biologiques tels  
30 que le sang, plasma, plaquettes, etc.

Un objet de la présente demande concerne une méthode pour détecter la présence ou le risque de développer une encéphalopathie chez un mammifère, comprenant la détermination de la présence (ou de l'absence), dans un échantillon biologique du mammifère, d'une molécule cible choisie parmi:

- 5           a) un acide nucléique comprenant une séquence choisie parmi SEQ ID NOs: 1 à 26 ou un fragment de celles-ci ayant au moins 5, de préférence 6, 7, 8, 9 ou 10 bases consécutives,
- b) un acide nucléique ayant une séquence complémentaire d'une séquence selon a),
- c) un analogue fonctionnel d'un acide nucléique selon a) ou b), ou
- 10          d) un polypeptide codé par un acide nucléique selon a) à c),

la présence (ou l'absence) d'une telle molécule cible dans l'échantillon étant une indication de la présence ou du risque de développer une encéphalopathie chez ce mammifère.

- Dans une variante particulière de mise en œuvre, la méthode comprend la détermination
- 15 (simultanée) de la présence ou absence d'au moins, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou plus des molécules cibles telles que définies ci-dessus. L'invention permet en effet d'établir et de déterminer un profil d'hybridation sur un ensemble de marqueurs, afin d'évaluer la présence ou le risque de développer une encéphalopathie chez un mammifère. Le profil d'hybridation est typiquement réalisé en utilisant une combinaison de plusieurs marqueurs
  - 20 choisis par les cibles indiquées ci-dessus, par exemple contenant l'ensemble de ces cibles.

- La molécule cible peut être la séquence complète du gène ou de l'ARN ou de la protéine correspondant aux séquences SEQ ID NOs: 1-26, ou un fragment de celles-ci, par exemple un fragment comportant un domaine de variabilité (épissage, délétion, polymorphisme,
- 25 etc.). Un analogue fonctionnel désigne plus particulièrement un analogue provenant d'une autre espèce (par exemple homme, mouton, etc.), ou un variant naturel résultant par exemple de polymorphisme, épissage, etc.

- Dans un mode de réalisation particulier, la méthode comprend la détermination de la
- 30 présence d'au moins un acide nucléique selon a) à c). Différentes techniques utilisables pour détecter une espèce d'acide nucléique dans un échantillon sont utilisables dans la présente invention, comme par exemple le Northern Blot, l'hybridation sélective,

l'utilisation de supports revêtus d'oligonucléotides sondes, l'amplification d'acide nucléique comme par exemple par RT-PCR, PCR quantitative et ligation-PCR, etc. Ces méthodes peuvent comprendre l'utilisation d'une sonde nucléique (par exemple un oligonucléotide) capable de détecter sélectivement ou spécifiquement l'acide nucléique cible dans l'échantillon. L'amplification peut être réalisée selon différentes méthodes connues en soi de l'homme du métier, telles que la PCR, la LCR, l'amplification médiée par transcription (TMA), l'amplification par déplacement de brin (SDA), NASBA, l'emploi d'oligonucléotides spécifiques d'allèles (ASO), l'amplification spécifique d'allèle, le Southern blot, l'analyse conformationnelle SSCA, l'hybridation in situ (e.g., FISH), la migration sur gel, l'analyse d'hétéroduplexes, etc.

Selon un mode préféré de mise en oeuvre, la méthode comprend la détection de la présence ou de l'absence d'un acide nucléique selon a) à c) par hybridation sélective ou amplification sélective.

15

L'hybridation sélective est typiquement réalisée en utilisant des sondes nucléiques, de préférence immobilisées sur un support, tel qu'un support solide ou semi-solide présentant au moins une surface, plane ou non, permettant l'immobilisation de sondes nucléiques. De tels supports sont par exemple une lame, bille, membrane, filtre, colonne, plaque, etc. Ils peuvent être réalisés en tout matériau compatible, comme notamment du verre, silice, plastique, fibre, métal, polymère, etc. Les sondes nucléiques peuvent être tout acide nucléique (ADN, ARN, PNA, etc.), de préférence simple-brin, comprenant une séquence spécifique d'une molécule cible telle que définie en a) à c) ci-dessus. Les sondes comprennent typiquement de 5 à 400 bases, de préférence de 8 à 200, plus préférentiellement moins de 100. Les sondes peuvent être des oligonucléotides synthétiques, produits sur la base des séquences de molécules cibles de l'invention selon des techniques de synthèse classique. Les sondes peuvent également être synthétisées directement in situ, sur le support, selon des méthodes connues en soi de l'homme du métier. Les sondes peuvent également être fabriquées par des techniques génétiques, par exemple par amplification, recombinaison, ligation, etc. Une telle sonde constitue un autre objet de la présente demande, ainsi que son utilisation (essentiellement in vitro) pour la détection d'une encéphalopathie chez un sujet. De manière particulièrement préférée, on

30

utilise un ensemble de sondes nucléiques comprenant tout ou un fragment de 5 bases consécutives au moins de chacune des séquences SEQ ID NO : 1-26, ou d'un brin complémentaire de celles-ci, avantageusement immobilisées sur un support.

- 5 L'hybridation peut être réalisée dans des conditions classiques, connues de l'homme du métier et ajustables par celui-ci (Sambrook et al). En particulier, l'hybridation peut être réalisée dans des conditions de stringence élevée, moyenne ou faible, selon le niveau de sensibilité recherché, la quantité de matériel disponible, etc. Par exemple, des conditions appropriées d'hybridation incluent une température comprise entre 62 et 67°C pendant 2 à 10 18 heures. Après l'hybridation, différents lavages peuvent être réalisés pour éliminer les molécules non-hybridées, typiquement dans des tampons SSC comprenant du SDS, tels que un tampon comprenant 0,1 à 10 X SSC et 0,1% SDS.

- Dans un mode de mise en oeuvre typique, les acides nucléiques (ou les puces ou supports) 15 sont pré-hybridés dans un tampon d'hybridation (Rapid Hybrid Buffer, Amersham) contenant typiquement 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon à 65°C pendant 30 min. Les acides nucléiques de l'échantillon sont ensuite mis en contact avec les sondes (typiquement appliqués sur le support ou la puce) à 65°C pendant 2 à 18 heures. De préférence, les acides nucléique de l'échantillon sont marqués au préalable, par tout 20 marquage connu (radioactif, enzymatique, fluorescent, luminescent, etc.). Les supports sont ensuite lavés dans un tampon 5X SSC, 0,1% SDS à 65°C pendant 30 min, puis dans un tampon 0.2X SSC, 0,1% SDS. Le profil d'hybridation est analysé selon des techniques classiques, comme par exemple en mesurant le marquage sur le support au moyen d'un instrument adapté (par exemple InstantImager, Packard Instruments). Les conditions de 25 l'hybridation peuvent naturellement être ajustées par l'homme du métier, par exemple en modifiant la température d'hybridation et/ou la concentration saline du tampon.

- L'amplification sélective est de préférence réalisée en utilisant une amorce ou une paire d'amorces permettant l'amplification de tout ou partie d'un des acides nucléiques cibles 30 dans l'échantillon, lorsque celui-ci y est présent. L'amorce peut être spécifique d'une séquence cible selon SEQ ID NO : 1-26, ou d'une région flanquant la séquence cible dans un acide nucléique de l'échantillon. L'amorce comprend typiquement un acide nucléique

simple-brin, d'une longueur comprise avantageusement entre 5 et 50 bases, de préférence entre 5 et 30. Une telle amorce constitue un autre objet de la présente demande, ainsi que son utilisation (essentiellement in vitro) pour la détection d'une encéphalopathie chez un sujet.

5

Dans un autre mode de réalisation, la méthode comprend la détermination de la présence d'un polypeptide selon d). La mise en évidence d'un polypeptide dans un échantillon peut être réalisée par toute technique connue en soi, comme notamment au moyen d'un ligand spécifique, par exemple un anticorps ou un fragment ou dérivé d'anticorps. De préférence, 10 le ligand est un anticorps spécifique du polypeptide, ou un fragment d'un tel anticorps (par exemple un Fab, Fab', CDR, etc.), ou un dérivé d'un tel anticorps (par exemple un anticorps simple-chaîne, ScFv). Le ligand est typiquement immobilisé sur un support, tel qu'une lame, bille, colonne, plaque, etc. La présence du polypeptide cible dans l'échantillon peut être détectée par mise en évidence d'un complexe entre la cible et le ligand, par 15 exemple en utilisant un ligand marqué, en utilisant un deuxième ligand de révélation marqué, etc. Des techniques immunologiques utilisables et bien connues sont les techniques ELISA, RIA, etc.

Des anticorps spécifiques des polypeptides cibles peuvent être produits par des techniques 20 conventionnelles, notamment par immunisation d'un animal non-humain avec un immunogène comprenant le polypeptide (ou un fragment immunogène de celui-ci), et récupération des anticorps (polyclonaux) ou des cellules productrices (pour produire des monoclonaux). Des techniques de production d'anticorps poly- ou monoclonaux, de fragments ScFv, d'anticorps humains ou humanisés sont décrites par exemple dans Harlow 25 et al., Antibodies: A laboratory Manual, CSH Press, 1988 ; Ward et al., Nature 341 (1989) 544 ; Bird et al., Science 242 (1988) 423 ; WO94/02602 ; US5,223,409 ; US5,877,293 ; WO93/01288. L'immunogène peut être fabriqué par synthèse, ou par expression, dans un hôte approprié, d'un acide nucléique cible tel que défini ci-avant. Un tel anticorps, monoclonal ou polyclonal, ainsi que ses dérivés ayant la même spécificité antigénique, 30 constituent également un objet de la présente demande, de même que leur utilisation pour détecter une encéphalopathie.

La méthode de l'invention est applicable à tout échantillon biologique du mammifère testé, en particulier tout échantillon comportant des acides nucléiques ou des polypeptides. On peut citer avantageusement un échantillon de sang, plasma, plaquette, salive, urine, selles, etc., plus généralement tout tissu, organe ou, avantageusement, fluide biologique

5 comportant des acides nucléiques ou des polypeptides. Dans un mode de mise en oeuvre préféré, l'échantillon est un échantillon de sang ou plasma. L'échantillon peut être obtenu par toute technique connue en soi, par exemple par prélèvement, par des techniques non invasives, à partir de collections ou banques d'échantillons, etc. L'échantillon peut par ailleurs être pré-traité pour faciliter l'accessibilité des molécules cibles, par exemple par

10 lyse (mécanique, chimique, enzymatique, etc.), purification, centrifugation, séparation, etc. L'échantillon peut également être marqué, pour faciliter la détermination de la présence des molécules cibles (marquage fluorescent, radioactif, luminescent, chimique, enzymatique, etc.).

15 L'invention est applicable à tout mammifère, de préférence choisi parmi les bovins, ovins et humains. La méthode de l'invention est particulièrement utile pour la détection de la tremblante du mouton chez les ovins, de l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB) chez les bovins, et de la maladie de Creutzfeld-Jakob (MCJ), le kuru et l'insomnie fatale familiale chez l'homme.

20

Un objet particulier de la présente demande concerne une méthode pour détecter la présence ou le risque de développer une ESB chez un bovin, comprenant la détermination de la présence (ou de l'absence), dans un échantillon biologique du bovin, d'une ou plusieurs molécules cibles choisies parmi:

- 25
- a) un acide nucléique comprenant une séquence choisie parmi SEQ ID NO: 1 à 26 ou un fragment de celles-ci ayant au moins 5, de préférence 6, 7, 8, 9 ou 10 bases consécutives,
  - b) un acide nucléique ayant une séquence complémentaire d'une séquence selon a),
  - c) un polypeptide codé par un acide nucléique selon a) ou b).

30

Un autre objet particulier de la présente demande concerne une méthode pour détecter la présence ou le risque de développer une ESB chez un bovin ou un ovin, comprenant la



mise en contact d'un échantillon biologique du bovin ou ovin contenant des acides nucléiques avec un produit comprenant un support sur lequel est immobilisé au moins un acide nucléique comprenant une séquence choisie parmi SEQ ID NO: 1 à 26, un fragment de celles-ci ayant au moins 5 bases consécutives, ou un acide nucléique ayant une  
5 séquence complémentaire de celles-ci, et la détermination du profil d'hybridation, le profil indiquant la présence ou le risque de développer une ESB chez le bovin ou ovin. De préférence, le produit comprend au moins 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 acides nucléiques différents choisis parmi les acides nucléiques mentionnés ci-dessus. Dans un mode particulier de mise en oeuvre, le produit comprend chacun des acides nucléiques de  
10 séquence SEQ ID NO: 1 à 26, un fragment de celles-ci ayant au moins 5 bases consécutives, ou un acide nucléique ayant une séquence complémentaire de celles-ci.

Un autre objet de la présente demande concerne un produit comprenant un support sur lequel est immobilisé au moins un acide nucléique comprenant une séquence choisie parmi  
15 SEQ ID NO: 1 à 26, un fragment de celles-ci ayant au moins 5 bases consécutives, un acide nucléique ayant une séquence complémentaire de celles-ci ou un analogue fonctionnel de celles-ci. De préférence, le produit comprend au moins 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 acides nucléiques différents choisis parmi les acides nucléiques mentionnés ci-dessus. Dans un mode particulier de mise en oeuvre, le produit comprend chacun des acides  
20 nucléiques de séquence SEQ ID NO: 1 à 26, un fragment de celles-ci ayant au moins 5 bases consécutives, ou un acide nucléique ayant une séquence complémentaire de celles-ci

Un autre objet de la présente demande concerne un produit comprenant un support sur lequel est immobilisé au moins un polypeptide codé par un acide nucléique comprenant  
25 une séquence choisie parmi SEQ ID NO: 1 à 26, un fragment de celles-ci ayant au moins 15 bases consécutives, un acide nucléique ayant une séquence complémentaire de celles-ci ou un analogue fonctionnel de celles-ci. De préférence, le produit comprend au moins 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 polypeptides différents choisis parmi les polypeptides mentionnés ci-dessus.

30

Le support peut être tout support solide ou semi-solide présentant au moins une surface, plane ou non, permettant l'immobilisation d'acides nucléiques ou de polypeptides. De tels

supports sont par exemple une lame, bille, membrane, filtre, colonne, plaque, etc. Ils peuvent être réalisés en tout matériau compatible, comme notamment du verre, silice, plastique, fibre, métal, polymère, polystyrène, téflon, etc. Les réactifs peuvent être immobilisés sur la surface du support par des techniques connues, ou, dans le cas des  
5 acides nucléiques, synthétisés directement in situ sur le support. Des techniques d'immobilisation incluent l'adsorption passive (Inouye et al., J. Clin. Microbiol. 28 (1990) 1469), la liaison covalente. Des techniques sont décrites par exemple dans WO90/03382, WO99/46403). Les réactifs immobilisés sur le support peuvent être ordonnés selon un schéma pré-établi, pour faciliter la détection et l'identification des complexes formés, et  
10 selon une densité variable et adaptable.

Dans un mode de mise en oeuvre, le produit de l'invention comprend un pluralité d'oligonucléotides synthétiques, d'une longueur comprise entre 5 et 100 bases, spécifiques d'un ou plusieurs acides nucléiques cibles définis en a) à c).

15

Les produits de l'invention comprennent typiquement des molécules contrôle, permettant d'étalonner et/ou normaliser les résultats.

Un autre objet de la présente demande concerne un kit comprenant un compartiment ou  
20 conteneur comprenant moins un acide nucléique comprenant une séquence choisie parmi SEQ ID NO: 1 à 26, un fragment de celles-ci ayant au moins 5 bases consécutives, un acide nucléique ayant une séquence complémentaire de celles-ci ou un analogue fonctionnel de celles-ci. De préférence, le produit comprend au moins 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 acides nucléiques différents choisis parmi les acides nucléiques mentionnés ci-dessus.

25 Dans un mode particulier de mise en oeuvre, le produit comprend chacun des acides nucléiques de séquence SEQ ID NO: 1 à 26, un fragment de celles-ci ayant au moins 5 bases consécutives, ou un acide nucléique ayant une séquence complémentaire de celles-ci. Le kit peut comprendre par ailleurs des réactifs pour une réaction d'hybridation ou immunologique, ainsi que, le cas échéant, des contrôles et/ou instructions.

30

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'un produit ou kit tel que défini ci-dessus pour la détection d'une encéphalopathie chez un sujet mammifère.

- Un autre objet de l'invention concerne un acide nucléique comprenant une séquence choisie parmi SEQ ID NO : 1-26, ou un fragment de celles-ci comprenant au moins 5 bases consécutives, ou un acide nucléique ayant une séquence complémentaire de celles-ci, ou un analogue fonctionnel de celles-ci, en particulier un analogue provenant d'une autre espèce. L'invention concerne également un vecteur de clonage ou d'expression comportant ces acides nucléiques, ainsi que toute cellule recombinante comprenant un tel vecteur ou acide nucléique.
- 5
- 10 Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'un acide nucléique comprenant une séquence choisie parmi SEQ ID NO : 1-26, ou un fragment de celles-ci comprenant au moins 5 bases consécutives, ou un acide nucléique ayant une séquence complémentaire de celles-ci, ou un analogue fonctionnel de celles-ci, en particulier un analogue provenant d'une autre espèce, pour la détection (essentiellement in vitro) d'une encéphalopathie chez
- 15 un sujet mammifère.

- Selon un exemple particulier de mise en œuvre de l'invention, on prélève un échantillon de sang d'un mammifère à tester. L'échantillon de sang est traité de manière à rendre les acides nucléiques plus accessibles, et ceux-ci sont marqués. Les acides nucléiques sont ensuite appliqués sur un produit tel que défini ci-avant et le profil d'hybridation est déterminé, permettant de diagnostiquer la présence ou non d'une encéphalopathie chez le sujet. La méthode de l'invention est simple, pratiquée ex vivo, sur des animaux vivants, et permet la détection précoce d'une maladie à prion.
- 20
- 25 Il est entendu que toute technique équivalente peut être utilisée dans le cadre de la présente demande pour déterminer la présence d'une molécule cible. La liste des séquences est donnée ci-après (N désigne toute base).

## REVENDICATIONS

1. Méthode pour détecter la présence ou le risque de développer une encéphalopathie chez un mammifère, comprenant la détermination de la présence, dans un échantillon biologique  
5 du mammifère, d'une molécule cible choisie parmi:

- a) un acide nucléique comprenant une séquence choisie parmi SEQ ID NO: 1 à 26 ou un fragment de celles-ci ayant au moins 5, de préférence 6, 7, 8, 9 ou 10 bases consécutives,
- b) un acide nucléique ayant une séquence complémentaire d'une séquence selon a),
- 10 c) un analogue fonctionnel d'un acide nucléique selon a) ou b) provenant d'une autre espèce ou un variant naturel, ou
- d) un polypeptide codé par un acide nucléique selon a) à c),

la présence d'une telle molécule cible dans l'échantillon étant une indication de la présence ou du risque de développer une encéphalopathie chez ce mammifère.

15

2. Méthode selon la revendication 1, comprenant la détermination (simultanée) de la présence d'au moins 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou plus des molécules cibles.

3. Méthode selon la revendication 1 ou 2, comprenant la détection de la présence ou de  
20 l'absence d'un acide nucléique selon a) à c) par hybridation sélective ou amplification sélective.

4. Méthode selon la revendication 1 ou 2, comprenant la détection de la présence ou de l'absence d'un polypeptide selon d) au moyen d'un anticorps spécifique ou d'un fragment  
25 ou dérivé de celui-ci.

5. Méthode selon la revendication 1, pour détecter la présence ou le risque de développer une ESB chez un bovin, comprenant la détermination de la présence, dans un échantillon biologique du bovin, d'une ou plusieurs molécules cibles choisies parmi:

- 30 a) un acide nucléique comprenant une séquence choisie parmi SEQ ID NO: 1 à 26 ou un fragment de celles-ci ayant au moins 5, de préférence 6, 7, 8, 9 ou 10 bases consécutives,

- b) un acide nucléique ayant une séquence complémentaire d'une séquence selon a),
- c) un polypeptide codé par un acide nucléique selon a) ou b).

6. Méthode pour détecter la présence ou le risque de développer une ESB chez un bovin ou  
5 un ovin, comprenant la mise en contact d'un échantillon biologique du bovin ou ovin  
contenant des acides nucléiques avec un produit comprenant un support sur lequel est  
immobilisé au moins un acide nucléique comprenant une séquence choisie parmi SEQ ID  
NO: 1 à 26, un fragment de celles-ci ayant au moins 5 bases consécutives, ou un acide  
nucléique ayant une séquence complémentaire de celles-ci, et la détermination du profil  
10 d'hybridation, le profil indiquant la présence ou le risque de développer une ESB chez le  
bovin ou ovin.

7. Utilisation d'une sonde nucléique spécifique d'un acide nucléique cible tel que défini  
dans la revendication 1, ladite sonde comprenant de 5 à 400 bases, pour la détection in  
15 vitro d'une encéphalopathie chez un sujet.

8. Utilisation d'une amorce nucléique permettant l'amplification de tout ou partie d'un  
acide nucléique cible tel que défini dans la revendication 1, ladite amorce étant simple-  
brin, d'une longueur comprise entre 5 et 50 bases, pour la détection in vitro d'une  
20 encéphalopathie chez un sujet.

9. Produit comprenant un support sur lequel est immobilisé au moins un acide nucléique  
comprenant une séquence choisie parmi SEQ ID NO: 1 à 26.

25 10. Produit comprenant un support sur lequel est immobilisé au moins un polypeptide codé  
par un acide nucléique comprenant une séquence choisie parmi SEQ ID NO: 1 à 26.

11. Kit comprenant un compartiment ou conteneur comprenant au moins un acide  
nucléique comprenant une séquence choisie parmi SEQ ID NO: 1 à 26.

30

12. Utilisation d'un acide nucléique comprenant une séquence choisie parmi SEQ ID NO :  
1-26, ou un fragment de celles-ci comprenant au moins 5 bases consécutives, ou un acide

nucléique ayant une séquence complémentaire de celles-ci, ou un analogue fonctionnel de celles-ci provenant d'une autre espèce ou un variant naturel, pour la détection in vitro d'une encéphalopathie chez un sujet mammifère.

## LISTE DE SEQUENCES

**SEQ ID NO : 1 – EXB-NROA0576 :**

5 *Homologie avec NM\_003576 : Homo sapiens serine/threonine kinase 24 (STE20 homolog, yeast) (STK24), mRNA. 4/2003*

1 GGTGTGGAGG TGTTCAAAGG CATTGACAAT CGGACTCAGA AAGTAGTCGC  
 10 51 CATAAAAATC ATTGACCTGG AGGAGGCAGA AGATGAGATC GAGGACATTC  
 101 AGCAGGAAAT CACAGTGCTG AGTCAGTGTG ACAGTCCCTA CGTAACCAAA  
 151 TATTACGGAT CCTACCTGAA GGACACTAAA TTGTGGATAA T  
 15

**SEQ ID NO :2 - Cluster NROA\_c584\_1 :**

*Homologie avec CB424646 : 598918 MARC 6BOV Bos taurus cDNA 3', mRNA sequence. 3/2003*

20 1 TATCTGCAGA ATTTCCCCTT GAGAAGCGTT ATGGGGTGCA GGTAAGTTAT  
 51 TACACAAGAG AAAGAAGTTT TCTTACTAAC AGCAAGATTA ATGGCACAAT  
 25 101 TCAACCAAAA CTCATATACA TTTTACTGCT TAATTTACAT ATTATTTTGG  
 151 TGGAAAAAAT AGTATTCTTT ATTCTTTCAG TTTCTTTATG CAAAAATACA  
 201 CTTCTACAGG GACATCACTT AGATGTTATG CAAACCTCCC CCCC  
 30

**SEQ ID NO : 3 – EXB-NROA1108 :**

*Homologie avec NM\_138402 : Homo sapiens hypothetical protein BC004921 (LOC93349), mRNA. 4/2003*

35 1 GAGACATTTG GCCAAAAGAG GAATTTCCAG GACACCAACA ACATCCATTA  
 51 TTCCATTATT CATTTGTTTC CTGAAGAGCA AACACTTCCT TGAAATTCTT  
 40 101 CTCAAATTCT GCCTCCAGTC TAAGCCCCAT TTGGCCAAAA TCATTGAACT  
 151 TGAAAGATGC CCTGTGGTTC TGAAAGATGA GACGCATGTC CCACACAAAC  
 201 CCTTCCACAT TGGAGTAGCC CTGCTCATTC AGCCTCTTCT TGATCTTGTC  
 45 251 CAGCCACATG GGCTCCTTGA GGTTTTTAGA AGCCTCTTTC ATATAATAAT  
 301 AATAGGGAAT CCTCACTATA ACGCT

50

**SEQ ID NO: 4 - Cluster NROA\_c450\_1 :**

*Pas d'homologie*

55 1 AAGCGTTATG CAGGTAGGCC GACAAGGCGA AGTGGGATGC CGGAGAGCGG

51 CCGAGTTATT GCTCCGAGGA GACCACGTTT ACCGGTTACT ATGGCGACCG  
101 CCCCATCCCG GATCACTATC AGCCGTTTAC CGCCGATGAG GCGACGTGGT  
5 151 TCCAGCTCTG GGAGACGGTG AGCGAGGGCA CTCCTACGTC GCCGCCCTTC  
201 GCGACGATTG AGGAACTGGC AGCCTACCTC GCCGAGTGGG GCGACTTCTG  
251 TGATCACAGG CGCGCCGTCG AGTCCATGGA CGCGCGCGAG ATTGAGCGCC  
10 301 TCCTGACGCT GAATGACCGG CACTAGTTCA AGGTGCGGCT GGGGGCAGCA  
351 GCGCGCCTAA GCTTTCTGCA AGACTGGCTG GGCGCCCAGC ATGATGGTCC  
401 GCGGCGGCGA GATCCTGACC AACCTGGGG ACATGGTGTC GTCGTGACCC  
15 451 TCGCCTAGCT CTCTCACACA CCTAGGAGGA AGAGATGACC ACCCCCAACA  
501 TTCGCGGCCA CGAGACCGAA GCCAAGGCC GCAAGGCGGC GATGAAGTGG  
20 551 TTCACCTTCA CGGACGGCAC CAAGCCTGTC GAGGGCGTCC ACTTCCACAT  
601 CAAGCAGAAC CACTTCGGGC TCTGGACCTT CCGGGAGGGC CCGGCTCCGA  
25 651 AGTCCGCCGG ACCCCGCATC ACTCATAACG CTTCTCAA

**SEQ ID NO: 5 – EXB-NROB1323 :**

30 *Homologie avec NM\_000982 : Homo sapiens ribosomal protein L21 (RPL21), mRNA.*  
5/2003

1 AGAAGCGTTA TTGCTGATAC CCGCTACATG TTCTCCAGGC CTTTCAGAAA  
51 ACATGGAGTT GTTCCTTTGG CCACATACAT GCGAATCTAC AGGAAGGGTG  
35 101 ATATTGTAGA TATCAAGGGA ATGGGTACTG TTCAAAAAGG AATGCCCCAC  
151 AAATGTTACC ATGGCAAAAC TGGAAGAGTC TATAATGTCA CCCAGCATGC  
40 201 TGTGTCATC ATTGTAAACA AACAAAGTTAA GGGCAAGATT CTTGCCAAGA  
251 GAATTAATGT GCGTATCGAG CATATTAAGC ACTCTAAGAG CCGAGATAGC  
301 TTCCTGAAAC GTGTGAAGGA AAATGATCAG AAAAAGAGGG AAGCCAAAGA  
45 351 GAAAGGGACT TGGGGTTAAC ACC

**SEQ ID NO :6 – EXB-NROA0588 :**

50 *Homologie avec AW325879 : 17199 MARC 1BOV Bos taurus cDNA 5', mRNA sequence.*  
4/2001

1 GGGCGGAGGT CACCCTGGGG ATCCTCCAGG GCCAGGCCCT GGCACAACCTC  
55 51 GTCTCCATCA CACAGATGGG CCGTCGCCTG GTCGTGGCTC TCAGGAGTCA  
101 GACCGGAAAA AGCCAGCCCT GGGGCAACCA GGAGCACCGA GGTGATGAGC



151 AGGACAGCCC AGGAGGTCAT GTTGAGGCAG CTGAAAGGTC TGTGCAAGTC  
 201 AATCATGAAG AAATTTCTCC GTACCATCAC CTCCC

5

**SEQ ID NO :7 – EXB-NROB1540 :**

*Homologie avec D37952 : Bovine NB10 mRNA for MHC class II (BoLA-DQB), partial cds. 2/1999*

10

1 CTTGTGTAGG CAGAGGTTCC AGGGTCAGTG GAGGAAGCAG CATCACAGCC  
 51 AGATCCATGG TTGGGGGATG GCCACGGGAA ATGACTTGGT GACTGACTCT  
 15 101 GATCTCAGAG TGGGACAGGC TGACAGGCAT CTGGGAATTC CGGGCAAGGT  
 151 CAGGCACGTA TTATAGAAGA GCAAACACCA ATCCCAAAT ATCCTCAGGA  
 201 ATCAGCGCAT GAGCCCCTTC TGGCTCCTGT GATGGATGAT GAGGCCCAGC  
 20 251 CCAAGGAAGA TCAGCCCCAG CACAAAGCCT CCAAC

**SEQ ID NO : 8 Cluster NROB\_c1\_-64 :**

25 *Homologie avec D76416 : Bovine mRNA for MHC class II DM alpha-chain (BoLA-DMA), complete cds. 2/1999*

30

1 TCTGCAGAAAT TCGCCTCTGA GAAGCGTTAT CCGTTGGACC CAANNNNNNN  
 51 NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNCAAGA GAAAAGATCA  
 101 GAGGGTGCTG GTGTGACGTT TAAGTAGGAA AAGGCCTGGA AGGTGAGTCC  
 151 ATCAACCGCG GAGACAAAAG TGGGCCCGGC TCCTTCCACA GGTGCCGACT  
 35 201 GATGCTGCCA GTTACCGGTC AGTGTGGGTC AACAC

**SEQ ID NO : 9 – EXB-NROB1371 :**

40 *Homologie avec NM\_006098 : Homo sapiens guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1 (GNB2L1), mRNA. 4/2003*

45

1 AAGCGTTATT TAGATAANNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN  
 51 NNNNNNTAC ACCCAGAGTA TTCCATAGTT TGATGGTTTT GTCTCGGGAG  
 101 CCAGAGACAA TTTGCCGGTT GTCAGAAGAG AAGGCCACAC TCAGCACATC  
 151 TTTGGTATGG CCTACAAATC GGCGAGTGGT GGTGCCCGTT GTGAGATCCC  
 50 201 AAAGGCGAAG GGTTCATCC CAGGAGCCTG AGAGGGCAAA TTGGCCATCT  
 251 GAGGAAATGA CCACATCACT AACAAAGTGG GAGTGACCCC GAAGAGCACG  
 55 301 CTGTGGGATA CCATAGTTGG TTTCATCTCT GGTCAGCTTC CACATAATGA

351 TGGTCTTATC TCGAGAGGCG GACGATATCA TGTCCGGGAA CTGGGGAGTG

**SEQ ID NO :10 - NROB\_c579\_1 :**

5 *Homologie avec D87076 : Homo sapiens mRNA for KIAA0239 gene, partial cds. 1/2003*

1 GGGCCAGGGG ATGATATGAA TGTCACAGGA GGAGACACCT TCTGTCTTTG  
 51 TTTCAAAGAA AGTTGATGTG CCATTTGTTA ATATACAAGA GAAATATTGA  
 10 101 AAATATATTG AAAAGAGCAA TTTTAAATTA TTTTGGCTT ATGTTGCAAT  
 151 ATTTATTTTC TTGTATTAGG AAAGATTCCT TTGTAGAAAA AAAATGTATT  
 15 201 TTTCATTAAC GCAAAAACCT ATTTCTCCTT TTTGTACATT GTCCATGTTC  
 251 GCTACCCTTA ACGAGCAATA GAATGTATGG CTGCCTCGGG GTGGCCGGTG  
 301 CCCGCGTGCC CTGCATGATT CTGTGGTCCC ACCACCATGT AGCTCCCAGT  
 20 351 CCCATCCTGT CCTGCTCACT CATGGGGGTT TCCAGAGCCT AGCCCCCT

**SEQ ID NO : 11 – Cluster NROA\_c125\_1 :**

25 *Homologie avec D45359 : Bos taurus mRNA for MHC class II DRB3, partial cds. 1/2003*

1 TGGATTGCAG GTGACTGAGA AAACCATCGA GGACAGTTTT TAAGGGGTCA  
 51 CTGAGCCAGG AGCAAATGAG ATCCTGAGAA AGTACTTCAT TGTGGAAGAG  
 30 101 TTAGCACTAA GCAGGAAACC TTTCCATGCT GTGAAGAAGC TGGGACAGAA  
 151 GGTTCTTCCT TGAGTGTGAC CATCTTCACT TCAGCTCAGG AGCCCTGTTG  
 35 201 GCTGAAGTGT AGGGCGTCCT TTCTGATTCC TGAAGTATAT TTATTAGCCC  
 251 CACGGCAAGG AAGAACAGAC TCAGAACGAA GCCCCCGACT CCACTCATCA  
 301 TCTTGCTCTG AGCAGAGTCA GACCGTGCCC TCCATTCTAC TGTGATAGGG  
 40 351 CTTGTCTGGC TGGGGTGCTC CACTTGCAA GTGTAGACCT GGCACCA

**SEQ ID NO :12 – Cluster NROB\_c0\_1 :**

45 *Homologie avec J01394 : Bos taurus mitochondrion, complete genome. 4/2001*

1 GCTGTCCAAA AAGGCCTCCG TTATGGAATA ATTCTTTTTA TTATCTCCGA  
 51 AGTACTATTC TTTACCGGAT TTTTCTGAGC TTTCTACCAC TCAAGCCTCG  
 50 101 CCCCCACCCC TGGGGGAGGC GGCTGCTGAC CCCCACAGG CATTACCCCA  
 151 CTAAACCCCC TAGAAGTCCC ACTGCTCAAC ACCTCTGTCC TATTGGCTTC  
 55 201 CGGAGTTTCT ATTACCTGAG CCCATCATAG TTTAATAGAA GGGGACCGAA  
 251 AGCATATATT ACAAGCCCTA TTTATCACCA TCACATTAGG AGTCTACTTC

5  
10  
301 ACACTACTAC AAGCCTCAGA ATACTATGAA GCACCTTTTA CTATCTCCGA  
351 CGGAGTTTAC GGCTCAACTT TTTTGTAGC CACAGGCTTC CACGGCCTCC  
401 ACGTCATCAT TGGGTCCAAC AAATAACGCT TCTCNNNNNN NNNNNNTGCA  
451 GATA

**SEQ ID NO :13 - Cluster NROA\_c1045\_-1 :**

*Homologie avec BM363411 : BS320054B20G01 Subtracted Lewin Cattle Spleen Bos taurus cDNA clone BS320054B20G01 5', mRNA sequence. 1/2002*

15  
20  
25  
1 1 GGGGAGGTAT CTGTACCCCA CGCAGAAATG CTTCTGACAG GCGGCANNNN  
51 NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN  
101 NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN CTGGCCGAA  
151 AAGCCTGAGG TAGTCTCGGC GGCAGAGCTT CCGGCCCAGC TTGTAGTAGA  
201 GCGCCCGGCC CACCTACCC

**SEQ ID NO : 14 – Cluster NROA\_c69\_1 :**

*Homologie avec NM\_003127 : Homo sapiens spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (alpha-fodrin) (SPTAN1), mRNA. 4/2003*

30  
35  
40  
45  
1 GAAGCGTTAT TGGAGGAGGC TAACCTAGGA GCAGAGGATC AGTTCACGAA  
51 GAGCGAGCGG GTGAACTCGA CGTAGTCAAA AGCAGTGGGG AGTTCGCGGC  
101 CCTTGCTGTC CACGTAGGGC TTCATGTGGG AGACGCAGTA GTCGGCTTGT  
151 TCCCGAGTCA AGTTCTGGTA CAGCTCCTCC TTGGTCACAT AAGGCTTCCC  
201 TTCAGAGCTC ACGGCCCGGA AGGCGCTCTC AATCTCCTCG CTGGACTTGA  
251 CGTTCTCCGT CTCACGGCTG ATCATAAAGG ACATGTACTC TTGCATGGAG  
301 ACGTGGACGT CCCTGTTAGG ATCCACAGTG TCCAAGATGG ACTCGAACTC  
351 AAGGTCGGGC TCCCCTTCCT CCAACATGGG CAGGTC

**SEQ ID NO : 15 – Cluster NROB\_c1\_12 :**

*Homologie avec BM431390: 1Duo15D10 Bos taurus Duodenum #1 library Bos taurus cDNA, mRNA sequence. 1/2002*

50  
55  
1 TCTGCAGAAT TCGCCTTTGA GAAGCGTTAT GGGGGCGAGG TGGTAAAGGA  
51 AGCTTACAAA ACAACTATTC TTTAAAAAAA AACAAAAAAA CAAAAAACA  
101 AAAACAGCA AAAGCCAACC GGCCCAATTT TGTCTCCAGT TTTCAACGTG

151 TGCTTTCGAG CATTCAGCT GTTCCAGTT ACTTTAGTTT CCAGATATTA  
 201 GTCTTCCATT TAGTTTTAAG ACTAAATCTC ACTTTTGGAT AAACACAAGG  
 5 251 AAATATTTTA CTTGCTGAAA AATCACTTTA CTGGATAAAG TTACCTCTTA  
 301 TGCCTTTCAG TTTTCTAATC CAACTTTCTG ACAACCAGTG GTAATTAGGA  
 351 AGTTCTAAGT TGCAGTTGTC CCTATGACTT TGGGCTTCCC TGGTGGCTCA  
 10 401 GCTGGTCAAA AATCTGCCTG CAATGCGGGA GACCTCCACC CCATAACGCT  
 451 TCTCAAAGGC GAATTCTGCA GA

15

**SEQ ID NO: 16 - Cluster NROA\_c21\_1**

*Homologie avec NM\_001416 : Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 1 (EIF4A1) mRNA*

20

1 TTGAGAAGCG TTATTGTGGG GAGGTCATAG TTGATGACTA AGGAAACTTG  
 51 CTGTACATCA ATACCTCTGG CCAGTAGGTC AGTGGTAATC AATACTCTGC  
 25 101 TGGAGCCAGA GCGGAACTCC CTCATGATAA CGTCTCGTTC TTTTGGTCC  
 151 ATGTCTCCGT GCATGGCAGA GACGGTGAAG TCTCGGGCAT GCATCTTCTC  
 201 GGTGAGCCAA TCCACCTTCC TTCGGGTGTT GATGAAGATG ACTGCCTGGG  
 30 251 TAATGGTCAG GGTTCATAC AAGTCGCACA GTGTGTCCAG CTTCCACTCC  
 301 TCTCGTTCCA CATTGATGTA GAACTGACGG ATACCCTCCA GCGTCAACTC  
 35 351 TTCCTTCTTG ACAAGAATTC TAATTGGGTC CCTCATGAAC TTCTTGGTCA  
 401 CCTCCCGCCC ATAACGCTTC TCAA

**40 SEQ ID NO: 17 - Cluster NROA\_c12\_1**

*Homologie avec NM\_15862: Homo sapiens actin related protein 2/3 complex, subunit 2, 43kDa 5ARPC2) transcript variant 1 mRNA*

45

1 CTTGTATGGT GTATGGAAGT TACTTGGTAA ATCCAGAATC AGGATACAAT  
 51 GTCTCCTTGC TATACGACCT TGAAAATCTG CCTGCATCCA AGGATTCCAT  
 101 CGTGCATCAA GCTGGCATGT TGAAACGAAA CTGTTTTGCC TCTGTCTTTG  
 50 151 AGAAATACTT CCAGTTCCAG GAATGAGGGC AAGGAATGAG AGTTAGGGGC  
 201 AGTTATCCAT TATAGGGATG ATGAGACCAT GTATGTTGAG TCAAAAAAAG  
 55 251 ACAGAGTCAC AGTAGTCTTC AGCACAGTGT TTAAGGATGA CGACGATGTG  
 301 GTCATTGGAA AGGTGTTTCAT GCAGGAGTTC AAAGAAGGAC GCAGAGCCAG

5  
351 CCACACAGCC CCACAGGTCC TCTTCAGCCA CAGGGAACCT CCCTTAGAGC  
401 TGAAAGATAC CGATGCCGCC GTGGGTGACA ACATTGGCTA CATTACCTTC  
451 GTGCTGTTCC CTGCCCCAAT ATAA

**SEQ ID NO: 18 - Cluster NROB\_c160\_1**

10

*Homologie avec AF513721 : Bos grunniens myosin regulatory light chain mRNA*

15  
1 1 CCAGTGTGTT GCCCCTGAGA AGCGTTATAT GCGGTAGTGA GGGGAATTTTC  
51 51 AATTACATCG AGTTCACACG CATCCTTAAG CATGGAGCGA AAGACAAAGA  
101 101 CGACTAAAAA GAACTTCAAA CTCCAGCCAA ACGTTCCTTG TTGCCACTCT  
20 151 GGGTATTTCT GAGACTTTCT CTTAGAGCCT GTTGCATGCC CTTAGCTTTA  
201 201 CAGCTTCTGC CTTTCTTTTG TATTTATTCT CAGCCATTG GGGCACATGC  
251 251 ATCTCTATAA TCAGACTGGA TATGGGACTT CTTGTCATTT TAAGAGTAGA  
25 301 AAATAGGGTA ATTTAACTTA CCAGCTGCCG TCTACCCTCC CCCAAAGTCA  
351 351 TAACGCTTCT CNNNNNNNCA GC

**30 SEQ ID NO: 18 - Cluster NROB\_c1\_11***Homologie avec BM429753: 1Duo20H3.ab1 Bos Taurus duodenum #1 library Bos Taurus cDNA, mRNA sequence*

35 1 TCTGCAGAAT TCGCCTCTGA GAAGCGTTAT GCTGAGAGGG GGGACTGGAA  
51 51 GCTTTGCTGA TATTTACTCA ATATTCACAA GGGGCCTGTG TAATGTGTTT  
40 101 CACAGGTAGT GCTAATGCTC AATGCAAGAT GCATTTACAGC CTTGTAATTC  
151 CTTTCATTTG AGTCTTTGAA CCATGTCCAA TGAACCAGAG CTCAAACTAA  
201 TCAATTTTGT AGTTGGTATT TGTTGGAGGG GAGGCAGGCA TGGACAGCAA  
45 251 TAGGGAGTGA GCTGGAGAGA TGCTTTGCTA ACCATAGTAA ACTGTGAAAA  
301 AATAGTTACT TCCTGAAAAA AGGAAATATT CTTGAGAGCA CCTTCATAAT  
351 GTCATCAAAT ACATGGCTAA ATACATTGTC TTGAGCCTCC TTCCTAATGT  
50 401 TTCTTAGTTT TTTTTCATAT TCCATCTTTA GTAATTCAAT TTCCCCCTCT  
451 TTTTCCTGCA TAATCTTCTC GCATGCTTGA GCACACTCCT TTTCCACTTT  
55 501 TTGATTTTCC ATTTCTAATT GATCAATATA TCTTT

**SEQ ID NO: 20 - Cluster NROB\_c1\_15**

*Homologie avec NM\_003127 : Homo sapiens spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (alpha-fodrin) (SPTAN1) mRNA*

5  
1 AGAAGCGTTA TCGGGTAGGC TAACCTAGGA GCAGAGGATC AGTTCACGAA  
51 GAGCGAGCGG GTGAACTCGA CGTAGTCAAA AGCAGTGGGG AGTTCGCGGC  
10 101 CCTTGCTGTC CACGTAGGGC TTCATGTGGG AGACGCAGTA GTCGGCTTGT  
151 TCCCGAGTCA GGTTCTGGTA CAGCTCCTCC TTGGTCACAT AAGGCTTCCC  
201 TTCAGAGCTC AGGGCCCGGA AGGCGCTCTC AATCTCCTCG CTGGACTTGA  
15 251 CGTTCTCGGT CTCACGGCTG ATCATAAAGG CCATGTACTC TTGCAGGGAG  
301 ACGTGGCCGT CCCTGTTAGG ATCCACAGTG TCCAGGATGG CCTCGAACTC  
20 351 AGGGTCGGGC TCCCCTTCCT CCACCATGGG CAGGTCATAG CCCAGGGAGC  
401 GCAGACAGGA TTTGAACTCC TGGTGGTTCA GCCGGCCAGA CTTGTCCTTG  
451 TCGAAGTGTT TGAACATCAT GCTGAATTCT TTGAGGGCCT TACAGATAAC  
25 501 GCTTCTCAAA GGCGAATTCT GCAGATA

**SEQ ID NO: 21 - Cluster NROB\_c1\_13**

*Homologie avec NM\_003295 : Homo sapiens tumor protein, translationally-controlled 1 (TPT1) mRNA*

30  
1 GAGAAGCGTT ATGGCGGGGA GGTACCGAAA GCACAGTAAT CACTGGTGTC  
35 51 GATATTGTCA TGAGCCATCA CTTGCAGGAA ACCAGCTTCA CAAAAGAAGC  
101 CTACAAGAAG TACATCAAAG ATTACATGAA GTCAATCAAA GGGAAACTTG  
40 151 AAGAACAGAG ACCAGAAAGA GTAAAACCTT TTATGACAGG GGCTGCAGAA  
201 CAAATCAAGC ACATCCTTGC TAATTTCAAA AACTATCAGT TCTTTATTGG  
251 TGAAAACATG AATCCAGATG GCATGGTTGC TCTGCTGGAC TACCGTGAGG  
45 301 ATGGTGTAAC CCCATATATG ATTTTCTTTA AGGATGGTTT AGAGATGGAA  
351 AAATGTTAAC AAAGTTGGCA GTTACTTTGG ATCAATCACC TCCCCCCCAT  
50 401 AACGCTTCTC TAATGCTTAT TCATGCAGAC AACACCAGGA CTTAGACAGA  
451 TGGGACTGAT GTCATCTCGA GCTCTTCATT TGTTTTGAAC GTTGATTTAT  
55 501 TTGGAGCGGA GGCATTGTTT TTGAGAAAAC GTGTCATGTA GGTCCC

**SEQ ID NO: 22 - Cluster NROB\_c795\_1***Homologie avec X85799 : B. Taurus mRNA from clone TUS4 (unknown function)*

```
5      1  GGGGTAGGTC AAAAAAAGTC CAAACCAAAA ACAAACCTG CCAAACCAA
      51  CAAAAACCT CCGAAATCTG AAGACAACTG AATCAATCCC TGCAGTCTCA
10     101  CTTTCTCTTG GAAAGAAAAG TTGGATAATC CAACCCTTTT ACAAAGGATA
      151  ATACAAGGGT GACAGTTCCA AGCTCTCAGG AACAGGGTCT TAGACGCTTT
      201  TGGAGGTTGA GAGGCACAAA ACGGCAGTCT GAAAATTCCT TTCATCTCAC
15     251  GGCAGTGATT GAGTTTAGAC TTGATTCTC CTCCCCTACC TACCCGATAT
      301  AACGCTTCTC
```

**20 SEQ ID NO: 23 - EXB-NROB0367-01***Homologie avec AJ318335: Ovis aries partial mRNA for high affinity IgE receptor gamma subunit (fcer1g gene)*

```
25     1  GAAGGGCAGG CGCGAAAGGC AGCTACAGCC AGTGAGAAAT CAGATGGCAT
      51  TTACACGGGC CTGAGCACCC GGACCCAGGA GACTTATGAG ACCCTGAAGC
30     101  ATGAGAAACC ACCACAATAG CTTTAGAACA GATGCCCTTT GTCACTTCCT
      151  T
```

**35 SEQ ID NO: 24 - EXB-NROB1653-01***Homologie avec NM\_004397 : Homo sapiens DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 6 (RNA helicase, 54 kDa) (DDX6)*

```
40     1  AATGTAAGGG GGATTAGAGT GATTATGGGA GCAGCTAAAG ATGAGAGGGG
      51  CTCAGTTTTT CGCAACACTA AATCTAAAAA GTATTTTGGC TTCTTACTGT
      101  AGAGAGCAGA CCTCTACAGG AATCCTACAT TGGAAAAGAG ACCCAGAGGT
45     151  CTGCGGTTCA CTGCTGCCAC ACTGTCTCAC ATAGTACCTT TGGAGTAGGC
      201  CTGACAGAGA GCACAGGGAA GCTTCAGAAA CCTGTAATTC AAGATTTTAT
      251  TTTTTTGAGA CGTTCTCTCT GATACTGTTC CCCGCCAGCC TTTTTTAAAA
50     301  GTTTGAGAAA CTTTTCAAGC TCTGCAAAAG GGGACAAAGA ATTTGCCTTG
      351  CAGTGTGGGG ATATGATTGA GCGGCAGTG
```

55

**SEQ ID NO: 25 - EXB-NROB1743-01**

*Homologie avec NM\_078480: Homo sapiens fuse-binding protein interacting repressor (SLAHBP1) transcript variant 1 mRNA*

5  
1 GTGGTAGGTG ACTGAGGAGT GTGGCAAGTT TGGTGCTGTC AACCGTGTCA  
51 TCATCTACCA AGAGAAGCAG GGCGAGGAAG AGGACGCGGA GATCATTGTC  
10 101 AAGATTTTTG TGGAGTTTTC CGTAGCCTCT GAGACTCACA AGGCCATCCA  
151 GGCCCTCAAT GGGCGCTGGT TTGCTGGCCG CAAGGTGGTG GCTGAAGTGT  
201 ATGACCAGGA GCGTTTTGAT AACAGTGACC TCTCTGCATG ACCTCCCCCC  
15 251 C

**SEQ ID NO: 26 - EXB-NROA1346-01**

20 *Homologie avec AB098926: Bos Taurus mRNA for similar to beta 2-microglobulin, partial cds*

25 1 GATCAGTACA GCTGCCGAGT GAAACACGTT ACTTTGGAAC AACCCCGGAT  
51 AGTTAAGTGG GATCGAGACC TGTAAGCAGC ACCATCGAGA TTTGAACATT  
101 CTTCAATTTGG TATAATATCT GGAAAATTCT GTTTCCTGC TCTTTAATAC  
30 151 TGATATGCTT TTATGCTTTA TGCGCATAAT CAGAAGTCAT ATTCATGTTA  
201 CCATAAATAC CTTCTTTATA ATTTTACCGT GGGTGCTACA TGTCCATGTT  
35 251 TGACCTTCCT AGGCAGGTGT CTGCAGTGGA GGTCCACAAA